

**DETECCIÓN MOLECULAR DE COMUNIDADES MICROBIANAS EN AGUA
PARA EL CONSUMO HUMANO EN EL MUNICIPIO DE SINCELEJO, SUCRE-
COLOMBIA**

ANA CRISTINA ARCIA URDA

**Trabajo de grado presentado para optar al título de
Bacterióloga (o)**

PEDRO JOSE BLANCO TUIRÁN

Director

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA**

MONTERÍA

2016

TABLA DE CONTENIDO

1. MARCO TEÓRICO	12
1.1. CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL AGUA POTABLE	12
1.2. ENFERMEDADES VEHICULIZADAS POR EL AGUA	14
1.2.1. Fiebre tifoidea y paratifoidea	14
1.2.2. Shigelosis	14
1.2.3. Amebiasis, Giardiasis y Criptosporidiosis	15
1.2.4. Cólera	15
1.2.5. Legionelosis	16
1.2.6. Gastroenteritis por <i>E. coli</i> O157H7	16
1.2.6. Toxoplasmosis	16
1.2.7. Gastroenteritis por Rotavirus	16
1.2.8. Hepatitis A y Hepatitis E	17
1.3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	17
1.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	17
1.3.2. Electroforesis	18
1.3.3. Secuenciación de ADN	19
2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVO GENERAL	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. METODOLOGÍA	21
3.1. ÁREA DE ESTUDIO	21
3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA DE ESTUDIO	21
3.3. TOMA DE MUESTRA	22
3.4. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	22

3.5.1. Centrifugación	22
3.5.3. Extracción de ADN	23
3.5.4 Protocolo PCR para detección de ADN bacteriano	23
3.5.5. Protocolo PCR para detección de ADN protozoario	24
3.5.6. Electroforesis	24
3.5.7. Purificación del ADN	24
3.5.8. Secuenciación y edición de secuencias	25
4. RESULTADOS	26
4.1. Caracterización de prácticas domésticas y hábitos asociados a la contaminación.	26
4.1.1. Presencia de animales domésticos:	26
4.1.2. Almacenamiento de agua potable:	26
4.1.3. Tratamiento previo al consumo del agua:	27
4.1.4. Frecuencia de limpieza tanques de almacenamiento:	28
4.2. Pruebas moleculares	28
4.2.1. Detección de ADN bacteriano	28
4.2.2. Detección de ADN protozoario :	29
5. DISCUSIÓN	31
6. CONCLUSIONES	35
7. RECOMENDACIONES	36
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ciclo de amplificación de la PCR	18
Figura 2. Comunas de Sincelejo-Sucre.	21
Figura 3. Resultado BLAST de las secuencias obtenidas de las muestras positivas.	30

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Presencia de animales domésticos en casa.	26
Gráfica 2. Almacenamiento agua de consumo.	27
Gráfica 3. Tratamientos previos al consumo del agua.	27

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Agentes patógenos transmitidos por el agua.	13
Tabla 2. Frecuencia de lavado de recipientes de almacenamiento de agua potable.	28
Tabla 3. Muestras positivas por comuna.	29

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por el agua representan un gran problema a la salud pública, siendo las causantes de altos índices de morbi-mortalidad en los seres humanos, éstas se dan por la presencia de bacterias, virus y protozoos, muchas veces dichos microorganismos resisten los procesos físico-químicos a los cuales es sometida el agua para su potabilización; por eso se buscó detectar a través de técnicas moleculares la presencia de comunidades microbianas en agua potable para el consumo humano en el municipio de Sincelejo, Sucre-Colombia. Para dicho estudio, se analizaron conductas y prácticas como (presencia de animales domésticos, almacenamiento del agua de consumo, frecuencia de lavado de recipientes y tratamiento antes de consumir el agua), se colectaron 84 muestras de forma aleatoria entre todas las comunas del municipio las cuales fueron sometidas a extracción de ADN por el método fenol-cloroformo y amplificación del fragmento 16S rARN y 18S rRNA mediante PCR para la detección de bacterias y protozoos respectivamente. Del total de muestras analizadas en tres se detectó ADN bacteriano, por lo que dichas muestras fueron enviadas a secuenciar para así lograr identificar clones de bacterias no cultivados, la detección de protozoarios no se pudo establecer. Para concluir, los factores de riesgos analizados se pueden relacionar con la presencia de bacterias y las técnicas moleculares como la PCR y la secuenciación son de gran ayuda al momento de identificar pequeños fragmentos de ADN en el agua como muestra de análisis.

Palabras clave: Agua, ADN, PCR, Bacteria, Protozoo, Enfermedad.

ABSTRACT

Diseases transmitted by water represent a major problem for public health, being the cause of high rates of morbidity and mortality in humans, they are produced by the presence of bacteria, viruses and protozoa, such microorganisms often resist the physical and chemical processes to which the water is subjected to purification; to detect through molecular techniques the presence of microbial communities in drinking water for human consumption in Sincelejo, Sucre, Colombia . For this study conducts and practices (the presence of pets, storage of drinking water and treatment before consuming water) were analyzed, 84 random samples were collected, which were subjected to DNA extraction by phenol-chloroform extraction method and amplification 16S rRNA fragment and 18S rRNA PCR for the detection of bacteria and protozoa respectively. Of the total samples analyzed in three was detected bacterial DNA and these products were sequenced to identify clones achieve uncultured bacteria. Detection of protozoan could not be established. In conclusion the risk factors analyzed maybe related to the presence of bacteria and molecular techniques as PCR and sequencing are useful when identifying small fragments of DNA in water as sample analysis.

Keywords: water, DNA, bacteria, PCR, protozoa, diseases.

INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso biológico que siempre ha estado en uso, desde el inicio de la vida hasta los tiempos actuales, los ecosistemas para mantener su equilibrio requieren de agua, los seres vivos no pueden prescindir del agua porque la necesitan para el metabolismo, incluso las grandes industrias y los diferentes sectores de la economía requieren del líquido vital como materia prima. Por lo tanto surge la necesidad de conservarla y mantener las condiciones de calidad de las fuentes naturales, de manera que se garantice su sostenibilidad y aprovechamiento para las futuras generaciones. (1)

El agua está destinada a muchos propósitos por lo que debe cumplir con ciertos criterios de calidad, uno de los más importantes destinos del agua es el consumo humano, de allí que se plantean algunos criterios o normas de calidad que se deben acatar con el fin de garantizar la inocuidad del líquido vital a la población. Dichos criterios se basan en algunas propiedades físico-químicas, microbiológicas y organolépticas del agua, parámetros que han establecido instituciones encargadas de velar por la seguridad y salud de los humanos, tales como OMS y OPS a nivel mundial, mientras en Colombia el INS es el encargado. (2)

Para abastecer de agua a toda la humanidad hay una serie de etapas, tales como la captación de las fuentes de abastecimiento, los análisis físicos-químicos y microbiológicos, el almacenamiento y la distribución; siendo cada uno de éstos importante para cumplir el propósito de suministrar agua potable y segura. Cada una de estas etapas representa riesgos para mantener la calidad del agua, un importante parámetro es el microbiológico puesto que implica importantes riesgos para salud de las personas. El riesgo microbiológico asociado al consumo de agua se considera de gran importancia debido a la gran demanda de ésta y es por ello que antes de ser enviada o distribuida debe asegurarse que esté libre de patógenos capaces de causar enfermedad en los humanos. (3)

Las enfermedades vehiculizadas y/ o transmitidas por el agua representan un grave problema a la salud pública porque generan altos índices de morbi-mortalidad en la población, sumado a esto el incremento en los gastos financieros que representa al sistema de salud las actividades encaminadas para corregir, reducir y/o eliminar esta problemática. Es de gran importancia conocer que hay muchos agentes patógenos transmisibles por el agua, tanto virus como bacterias y protozoos, que son capaces de generar una amplia variedad de cuadros clínicos diferentes en los individuos que tengan contacto o ingieran aguas contaminadas con dichos organismos. (4)

Existen muchas técnicas microbiológicas para determinar la presencia o ausencia de bacterias, virus y protozoos en el agua, métodos como los aislamientos y cultivos que permiten incluso identificar las especies presente o no en una muestra de agua, pero que presentan algunas limitaciones tales como la viabilidad del microorganismo, sólo son detectables si son metabólicamente activos, a diferencia de las técnicas de biología molecular que han optimizado algunos procesos y como en el caso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por su sigla en inglés) que permite establecer la presencia del microorganismo, debido al ADN, por lo que no se requiere que el microorganismo esté vivo. (5)

De las enfermedades transmitidas por el agua, la diarrea es la más frecuente por lo que ha ganado gran importancia como evento de interés en salud, en el mundo la relación agua- salud tiene una gran importancia y fuerte dimensión local, afectando a alrededor de 1.1 billones de personas que carecen de acceso a fuentes de agua potable mejoradas, y unos 2.4 billones de personas con falta de saneamiento adecuado.(6)

En Colombia, un país en desarrollo donde no todos los habitantes cuentan con cobertura total de las necesidades básicas, entre ellas el acceso a agua potable, se han empleado sistemas de vigilancia que permitan evaluar la calidad del agua potable que consumen los colombianos, en el informe número 5 de Mayo de 2016 del SIVICAP (sistema de información de la vigilancia de calidad del agua) se

reporta que de los más de 1100 municipios del país sólo se reportaron muestras de 344, por lo que la cobertura de vigilancia no supera el 32,6% en este periodo. Durante éste periodo en el departamento de Sucre se valoraron diez municipios de los cuales 2 se encuentran en alto riesgo para la salud de acuerdo a la caracterización del Índice de Riesgo de la Calidad del Agua para Consumo Humano IRCA. (7)

Por lo tanto, surge la necesidad de conocer el estado microbiológico del agua potable que consumen los habitantes del municipio de Sincelejo.

1. MARCO TEÓRICO

El agua es un recurso hídrico que se considera vital para el desarrollo de la vida en el planeta, entre ellos los humanos; los cuales realizan muchas actividades diarias y éstas en su mayoría requieren de agua. Por ello se ha dado al importante recurso muchos usos entre ellos: industrial, agrícola, tecnológico, energético, saneamiento básico y consumo, entre otros.

Para que el agua sea apta para consumo por los humanos debe someterse a procesos de potabilización que garanticen la seguridad para el consumidor y de esta forma evitar la presentación de cualquier efecto adverso tras su consumo, en Colombia se considera como agua potable aquella que cumple con las características físico-químicas y microbiológicas establecidas en el Decreto 1575 de 2007.

1.1. CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL AGUA POTABLE

El agua potable sale de las plantas de tratamiento cumpliendo las normas establecidas, pero en las vías de distribución desde los acueductos hasta las viviendas o incluso en el almacenamiento se pueden presentar ciertas alteraciones en la calidad microbiológica de la misma; entre los factores que afectan la calidad del agua se encuentra que los Sistemas funcionen con intermitencia, plantas de tratamiento poco eficientes, ausencia o problemas con la desinfección, redes de distribución en condiciones precarias, conexiones domiciliarias clandestinas y mal hechas. (8)

Es necesario poner a disposición de sus consumidores un abastecimiento seguro y satisfactorio, disminuyendo los riesgos por agentes biológicos (bacterias, virus y protozoos), para esto se utilizan plantas de tratamiento con las cuales se busca eliminar todos aquellos agentes patógenos que puedan causar alguna enfermedad a aquellas personas que lo consuma. Sin embargo en el mundo, millones de

personas mueren anualmente por enfermedades diarreicas, muchas de ellas causadas por contaminación del agua de consumo humano. (9,10)

La calidad del agua potable puede verse afectada durante su recorrido desde la planta de tratamiento hasta el punto de consumo, pudiéndose presentar contaminación a lo largo de la red, como consecuencia de la existencia de fugas durante reparaciones en tramos de tuberías, instalación de tuberías nuevas y conexiones cruzadas, debido a actividades físicas, químicas y biológicas de gran complejidad que toman lugar durante el proceso de transporte del agua (11)

Puesto que la formación de biopelículas en las redes de transporte o en los recipientes de almacenamiento, las fugas de las redes y el contacto de estas con aguas residuales también contribuyen a que dicha agua que se consideraba potable desde el punto de vista microbiológico deje de serlo ya que la composición microbiana va a cambiar y puede que microorganismos patógenos que estaban ausentes aparezcan.

La tabla N° 1 muestra una relación entre los microorganismos más frecuentes transmitidos por el agua y su importancia para la salud. Evidenciando como el indispensable recurso en presencia de éstos se convierte en peligroso para aquellos que lo consumen debido a su gran potencial para transmitir importantes enfermedades de origen hídrico. (12,13,14)

Tabla N° 1 Agentes patógenos transmitidos por el agua

BACTERIAS	IMPORTANCIA PARA LA SALUD	RESISTENCIA A LA CLORACION
<i>Campylobacter jejuni</i>	ALTA	BAJA
<i>E. coli</i> entero hemorrágica	ALTA	BAJA
<i>Legionella spp</i>	ALTA	ALTA
<i>Micobacterias no tuberculosas</i>	BAJA	MODERADA
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	MODERADA	BAJA
<i>Salmonella typhi</i>	ALTA	BAJA
<i>Shiguella spp</i>	ALTA	BAJA

<i>Vibrio colerae</i>	ALTA	BAJA
PROTOZOOS		
<i>Acanthamoeba spp</i>	ALTA	ALTA
<i>Cryptosporidium parvum</i>	ALTA	ALTA
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	ALTA	ALTA
<i>Giardia intestinalis</i>	ALTA	ALTA
<i>Toxoplasma gondii</i>	ALTA	ALTA
<i>Naegleia fowleri</i>	ALTA	ALTA
<i>Entamoeba Histolytica</i>	ALTA	ALTA
VIRUS		
<i>Adenovirus</i>	ALTA	ALTA
<i>Enterovirus</i>	ALTA	ALTA
<i>Virus de Hepatitis A</i>	ALTA	ALTA
<i>Virus de Hepatitis E</i>	ALTA	ALTA
<i>Rotavirus</i>	ALTA	ALTA

Tomado de: *Riesgo microbiológico en sistemas de abastecimiento de agua para consumo humano y modificado por Ana Arcia.* (15)

1.2. ENFERMEDADES VEHICULIZADAS POR EL AGUA

Al tener el agua una amplia distribución mundial y por ende gran parte de la población alrededor del planeta tiene acceso a ésta a pesar de que algunas comunidades carecen de la misma, ésta se convierte en fuente de transmisión de enfermedades importantes, a las cuales se les conoce como enfermedades de origen hídrico (EOH).

El grupo de EOH es amplio y se consideran de gran interés en la salud pública por la cantidad de muertes que ocasionan y el gran número de personas que afecta. A continuación trataremos brevemente las EOH por microorganismos, dentro de las cuales se encuentran las siguientes:

1.2.1. Fiebre tifoidea y paratifoidea: La fiebre tifoidea y la fiebre paratifoidea son causadas por *Salmonella typhi* y *S. paratyphi* respectivamente; se trata de una

enfermedad bacteriana sistémica prevenible, que se relaciona con precarias condiciones ambientales, ausencia de agua potable, inadecuada disposición de excretas, mala higiene personal y falta de un control adecuado de manipuladores de alimentos. En Latinoamérica, Asia y África se encuentran rangos de prevalencia de 200 a 500 casos por 100.000 habitantes. (13, 14)

1.2.2. Shigelosis: La shigelosis, también conocida como disentería bacilar, es causada por bacterias del género *Shigella spp*, considerándose más agresiva el serovar *s. dysenteriae*. Es una infección bacteriana aguda que afecta el intestino grueso y la porción distal del intestino delgado, se caracteriza por diarrea acompañada de fiebre, náusea y algunas veces toxemia, vómito, cólicos y tenesmo. En los casos típicos, las heces contienen sangre y moco. Las personas se infectan tras el consumo de agua y alimentos contaminados con la bacteria, la vía más común es la fecal-oral.(15; 9)

1.2.3. Amebiasis, Giardiasis y Criptosporidiosis: son cuadros clínicos cuyos agentes etiológicos son *E. histolytica*, *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium spp* respectivamente los cuales tienen en común el ser protozoarios intestinales y que la infección se da por el consumo de alimentos y aguas contaminados con estos microorganismos. A demás poseen formas de resistencia que les confiere protección frente a los procesos de potabilización y cloración del agua, lo que hace que sean importantes causantes de cuadros de diarreas agudas y crónicas tanto en individuos inmunológicamente competentes como en inmunocomprometidos, siendo este último el caso de la criptosporidiasis. (19)

1.2.4. Cólera: Es un tipo de gastroenteritis producida por la bacteria *Vibrio cholerae* que se transmite generalmente por el consumo de agua contaminada y de alimentos como lo mariscos y las hortalizas. Suele presentarse con vómitos y malestar estomacal acompañando la diarrea profusa y la pérdida de electrolitos, puede cursar de un cuadro leve a uno fatal. La enfermedad se encuentra eliminada en algunos países desarrollados por la implementación de excelentes

métodos de potabilización que han logrado controlar la presencia del microorganismo. (12)

1.2.5. Legionelosis: Es una infección respiratoria producida por la inhalación de aerosoles contaminados con la bacteria *Legionella pneumophila* cuyo cuadro clínico cursa con neumonía y se conoce como la enfermedad del legionario. Es un entidad clínica de gran cuidado por ser de rápida evolución, por la gravedad y letalidad de la misma; la población más afectada es aquella con un sistema inmunológico deficiente y que padecen enfermedades de base. (12, 33)

1.2.6. Gastroenteritis por *E. coli* O157H7: La *E. coli* enterotoxigénica (ECET) es la causante de gastroenteritis o diarrea del viajero por el consumo o ingesta de aguas contaminadas tras un periodo de incubación de 1-2 días y una persistencia de 3-5 días. se presentan dolor tipo cólico, náuseas y vómitos acompañados una diarrea acuosa. (4, 12)

1.2.6. Toxoplasmosis: La toxoplasmosis, popularmente asociada a la presencia de mascotas como los gatos en el hogar, es una enfermedad causada por un parásito que puede estar presente en el agua que ingerimos, *Toxoplasma gondii*, los tratamiento de potabilización pueden eliminar bacterias y virus, pero éstos protozoos son difíciles de destruir ya que forman ovoquistes. Responsables de la infección tras su ingestión. La toxoplasmosis puede ocasionar secuelas en los bebés de madres que se infectaron durante la gestación por lo que se considera una enfermedad de interés para la salud pública. (13)

1.2.7. Gastroenteritis por Rotavirus: El rotavirus es la primera causa de gastroenteritis aguda en niños menores de cuatro años es un cuadro que cursa con una pérdida excesiva de agua y electrolitos, a través del tracto gastrointestinal, por medio de un aumento del número de deposiciones. se contrae tras el consumo de alimentos y agua contaminados con el virus y por la vía fecal-oral. (9)

1.2.8. Hepatitis A y Hepatitis E: La hepatitis A es una enfermedad hepática causada por el virus de la hepatitis A (VHA). Éste se transmite principalmente cuando una persona no infectada (y no vacunada) come o bebe algo contaminado por heces de una persona infectada por ese virus. La enfermedad está estrechamente asociada a la falta de agua salubre, un saneamiento deficiente y una mala higiene personal. El virus de la hepatitis A es una de las causas más frecuentes de infección de transmisión por agua y alimentos.

La hepatitis E es una enfermedad hepática causada por el virus de la hepatitis E (VHE). El virus se excreta en las heces de las personas infectadas y entra en el organismo humano por el intestino. Se transmite principalmente a través del agua de bebida contaminada. La infección suele ser autolimitada y se resuelve en 2-6 semanas, pero a veces causa una enfermedad grave, denominada hepatitis fulminante (insuficiencia hepática aguda), que puede ser mortal.

1.3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Se conoce a la biología molecular como el área de la biología que se encarga del estudio de todos los procesos celulares regulados por moléculas biológicamente importantes entre las cuales se encuentra el ADN y el ARN, las cuales se relacionan directamente con la genética logrando así ser útil en muchísimos campos de aplicación debido a su alta sensibilidad y especificidad.

1.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio que permite la copia in vitro de secuencias específicas de DNA y que ha revolucionado el campo de la Biología Molecular. La técnica de PCR permite obtener, a partir de una sola molécula de ADN, millones de copias de un fragmento de ADN particular, la figura 1 muestra las etapas de la PCR. (20)

Esta técnica es muy útil en el estudio de la calidad del agua para la detección y caracterización de microorganismos ya que posee mayor sensibilidad y especificidad que otras, tales como la microscopia. Para los laboratorios de control

de calidad de alimentos representa mucha utilidad y ofrece grandes ventajas ya que permite el procesamiento de un gran volumen de muestras y obtención de resultados en corto tiempo, logrando así la optimización de los procesos. De igual manera con todas las ventajas y características mencionadas anteriormente la PCR presenta sus desventajas y dificultades entre las cuales se encuentra la manipulación post-PCR a los productos, optimizar las condiciones de la técnica puede llegar a ser un reto y la indistinción entre células vivas o muertas, por lo que en algunas circunstancias es necesario complementar con procesos convencionales como cultivos. (40, 41, 42)

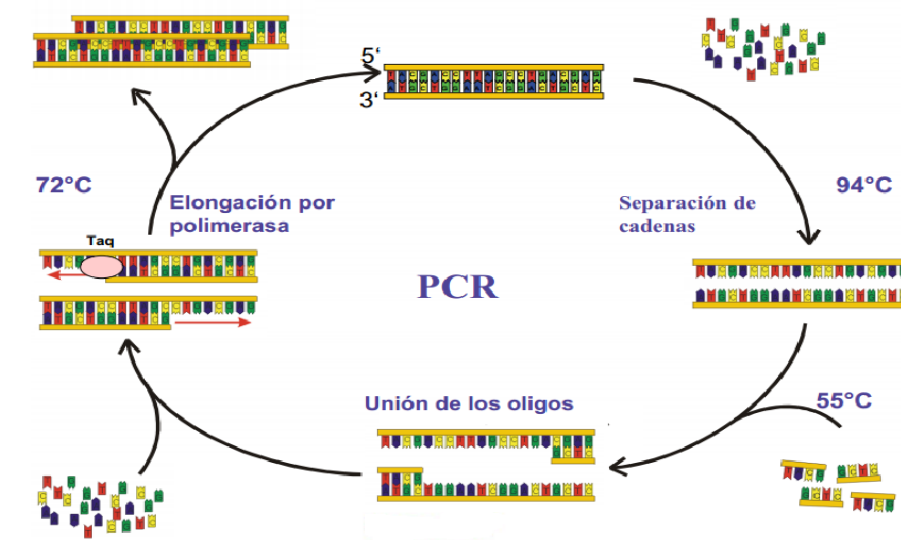


Figura 1. Ciclo de amplificación de la PCR (de Padro E., 2010).

1.3.2. Electroforesis

Es un método para visualizar fragmentos de ADN o las proteínas de algún ser vivo o los productos obtenidos mediante PCR, se basa en la capacidad de dichas moléculas para migrar a través de una matriz sólida que puede ser de agarosa o poliacrilamida. Se ha empleado mucho en la detección de *Salmonella spp*, *Campylobacter spp*, *Shiguela spp* y ECET tras la realización de PCR para evaluar la calidad de aguas tratadas y no tratadas (21,41)

1.3.3. Secuenciación de ADN

Es un análisis detallado que a través de la diferenciación de ADN permite la identificación de individuos, en la actualidad es mucho más fácil puesto que gracias a los trabajos de muchos investigadores se han logrado crear bancos de secuencias que permiten identificar la región de interés analizada mucho más rápido. La secuenciación del ADN consiste en dilucidar el orden de los nucleótidos de un polímero de ADN de cualquier longitud.(20),22)

Los resultados obtenidos de la secuenciación se expresan en formas de cromatogramas o electroforegramas, los cuales contienen los datos leídos por el secuenciador, es decir, la secuencia de nucleótidos y se puede analizar a través de bibliotecas genómicas en la web.

Esta técnica facilita la interpretación de resultados obtenidos tras el análisis de muestras biológicas y de alimentos representando para las industrias alimentarias una gran herramienta permitiendo el procesamiento de grandes volúmenes de muestra en corto tiempo. Para la identificación de microorganismos poco frecuentes en el agua de consumo y con potencial patógeno para humanos como es el caso de *Cryptosporidium parvum*, que muchas veces escapan de los análisis convencionales, puesto que la reglamentación no exige su pesquisa en el preciado líquido, investigaciones apoyadas en estas técnicas moleculares de alta sensibilidad y especificidad que demuestren su presencia en aguas para consumo humano que se consideran seguras serían de gran utilidad para considerar la obligatoriedad en su determinación y de esta forma garantizar a los consumidores productos libres de patógenos. (21, 26, 40, 42)

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

- Detectar la presencia de comunidades microbianas en agua potable para el consumo humano en el municipio de Sincelejo, Sucre.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar prácticas y hábitos de los sincelejanos que se asocian a la contaminación microbiológica de agua potable almacenada en las comunas de Sincelejo.
- Determinar la presencia de bacterias y protozoos en agua potable de diferentes comunas en Sincelejo.
- Identificar los microorganismos presentes en agua potable para el consumo humano en Sincelejo, Sucre.

3. METODOLOGÍA

3.1. ÁREA DE ESTUDIO

El municipio de Sincelejo es la capital del departamento de Sucre, se encuentra ubicado al noroeste de Colombia, 9° 18' latitud norte, 75° 23" latitud oeste del meridiano de Greenwich , perteneciente a la subregión de la Sabana a una altura de 213 m sobre el nivel del mar además cuenta con una población de 279,027 habitantes (23)

El municipio está distribuido de la siguiente manera: la zona urbana consta de 9 comunas, cada una a su vez con varios barrios; mientras la zona rural está conformada por 21 corregimientos.

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA DE ESTUDIO

Para el trabajo de investigación se tomaron las 9 comunas de la Zona urbana, de las cuales fueron seleccionadas aleatoriamente 84 muestras, dato calculado teniendo en cuenta población del total de viviendas distribuidas en las 9 comunas del municipio de Sincelejo, con un error del 5% y un IC del 95%.

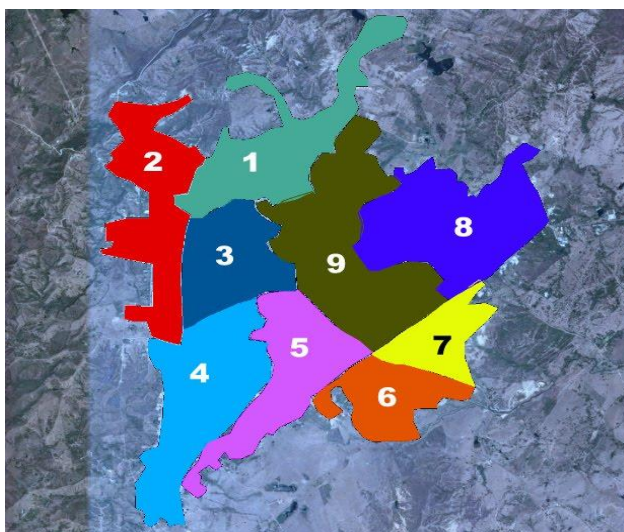


Figura 2. Comunas de Sincelejo-Sucre. Tomado de <https://elknol.files.wordpress.com/2009/02/captura-de-pantalla-completa-05022009-100012-p-m-bmp1.jpg>

3.3. TOMA DE MUESTRA

Las muestras a analizar consistieron en agua potable almacenada en los hogares sincelejanos seleccionados aleatoriamente para el estudio por lo que el jefe de cada hogar debía responder una encuesta en la cual se evaluaron factores de riesgo y firmar el consentimiento informado, posteriormente se procedió a la toma de muestra; para lo cual, se empleó dos tubos estériles tipo Falcon® de 50 ml por cada vivienda, asegurándose que los dos tubos se tomaban del mismo contenedor o recipiente donde el agua era almacenada. Las muestras se recolectaron en horas de la mañana por criterio de los investigadores y posteriormente llevadas al *Laboratorio Investigaciones Biomédicas - Universidad de Sucre* en neveras portátiles equipadas con gel refrigerante previamente congelado a -20°C para conservarlas temperatura entre los 4 y 8 grados centígrados para su posterior análisis.

3.4. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Para realizar la extracción de ADN del agua recolectada primero se usaron dos métodos diferentes de separación y/o concentración de los posibles microorganismos presentes en dicha muestra. Para lo cual se siguió el siguiente protocolo:

3.5.1. Centrifugación: Se tomó uno de los dos tubos de 50 ml por cada muestra y se sometieron a centrifugación por 20 minutos a 7600 rpm, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en PBS 1X para conservar y mantener el equilibrio osmótico de los individuos presentes. Alícuotas de 500 µl fueron dispuestas en viales para la posterior extracción de ADN.

3.5.2. Filtración por membrana: los 50 ml de agua restantes se filtraron a través de membranas de nitrocelulosa Millipore® de 0,45 µm de diámetro empleando un equipo de filtración formado por la bomba de vacío, el filtro de membrana y el recipiente colector del filtrado. Las membranas fueron dispuestas en viales para la posterior extracción de ADN. (24)

3.5.3. Extracción de ADN: Para extraer el ADN se usó el método Fenol-cloroformo 50-50-50 (25) con algunas modificaciones, el cual se describe a continuación.

A cada vial con su contenido se le agregó 500 µl de Buffer de Lisis (50 mM de Tris HCl, 50 mM EDTA pH 8, 1 % de SDS y 50 mM de NaCl) y 1 µl de β-mercaptoetanol, se sometió a vórtex por 3 segundos y centrifugación a 1400 rpm durante 3 minutos. Se tomó el sobrenadante, y se determinó el volumen, para adicionar 0.5 volúmenes de fenol - cloroformo/alcohol isoamílico, se homogenizó con vórtex durante 2-3 segundos. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 3 minutos y el sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo de 2ml. Luego se adicionó un volumen igual de cloroformo, se centrifugó y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo. Se determinó el volumen y se adicionó 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M y 0.7 volúmenes de isopropanol y se centrifugó a 14000 rpm durante 30 minutos a 10 °C. Se descartó el sobrenadante con cuidado y se le adicionó 500 µl de etanol al 70%. Se centrifugó durante cinco minutos. Finalmente se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 50 µl de buffer TE (Tris-EDTA) con el propósito de evitar la degradación del ADN.

3.5.4 Protocolo PCR para detección de ADN bacteriano: Para la detección de bacterias se amplificó el gen 16s RNA, haciendo uso de los cebadores 27f.1 (5'AGRGTTCGATCMTGGCTCAG3') y 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT 3') (24) Cuyo producto originado es de aproximadamente 1500pb, como enzima se usó polimerasa GoTaq® Flexi DNA Polymerase de Promega, para obtener una reacción de volumen final de 25 µl se empleó 100 ng/µl de ADN y 0.1µM de los cebadores. El perfil térmico requerido fue el siguiente: **Desnaturalización:** 94 °C por 5 minutos, **alineamiento:** 58 °C durante 45 segundos, **extensión:** 30 ciclos de 40 segundos a 72° C.

Para verificar que el protocolo funcionaba y las muestras positivas en realidad fueran positivas se usó como control positivo un Pool bacteriano obtenido a partir

de cultivos donde se incluyó ADN de *E. coli* y *Salmonella spp.* Como control negativo en lugar de adicionar ADN a la reacción, se usó agua ultra pura.

3.5.5. Protocolo PCR para detección de ADN protozario: Para la detección del genoma de protozoarios a partir del gen 18s RNA se utilizaron los cebadores P-SSU- 342f (5'CTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTAC-3') y MedlinB (5'TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC 3'), (26) los cuales originan un producto de aproximadamente 1360 pb.

La reacción de PCR se realizó con GoTaq® Flexi DNA Polymerase de Promega en un volumen final de reacción de 25 µl, que contenía 100 ng/ul de ADN y 0.4µM de los cebadores. El perfil térmico de amplificación iniciaba con: desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos desnaturalización a 94 °C durante 1 min, alineamiento a 65°C durante 1 min, extensión a 72 °C durante 1 min y una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

Como control positivo para garantizar el éxito de la PCR se emplearon varias muestras, correspondiendo estas a ADN puro a partir de cultivos celulares de *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, y *Leishmania spp.*

El control negativo se hizo de la misma forma que en la detección de ADN bacteriano con la diferencia de primers universales para protozoos.

3.5.6. Electroforesis: Los productos obtenidos de ambos protocolos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, el cual fue sometido a 90 voltios durante 40 minutos, dichos resultados fueron visualizados en un fotodocumentador con el apoyo de un marcador de peso molecular de 100 pb. Fueron consideradas positivas aquellas muestras que generaron bandas de 1500 y 1360 pb para bacterias y protozoos respectivamente.

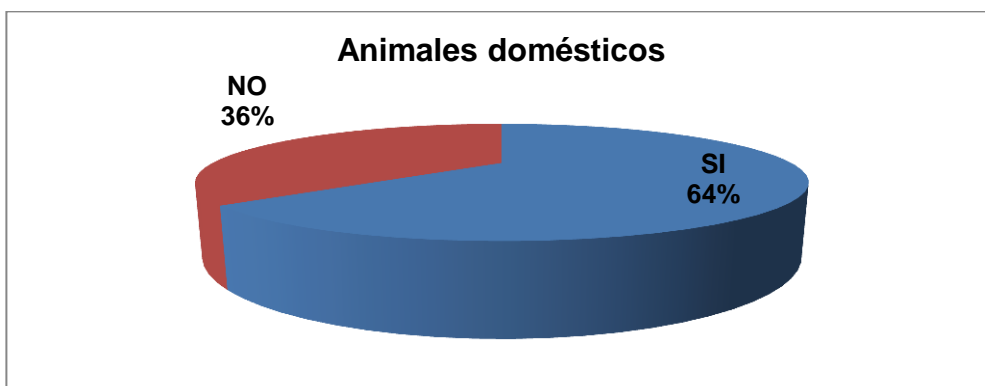
3.5.7. Purificación del ADN: Las bandas obtenidas en el gel de agarosa que se identificaron como positivas fueron extraídas de éste y purificadas haciendo uso del Kit de extracción de Invitrogen PureLink® Quick Gel Extraction Kit, para lo cual se siguió el protocolo establecido por la casa comercial. (27)

3.5.8. Secuenciación y edición de secuencias: Los productos de PCR purificados, que fueron considerados como positivos, fueron enviados a la empresa MacroGen, Seoul – Korea para su secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas utilizando el programa MEGA 6, y utilizando la herramienta BLAST de la base de datos GenBank se buscó homologías de las secuencias obtenidas con las registradas en la base de datos.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de prácticas domésticas y hábitos asociados a la contaminación.

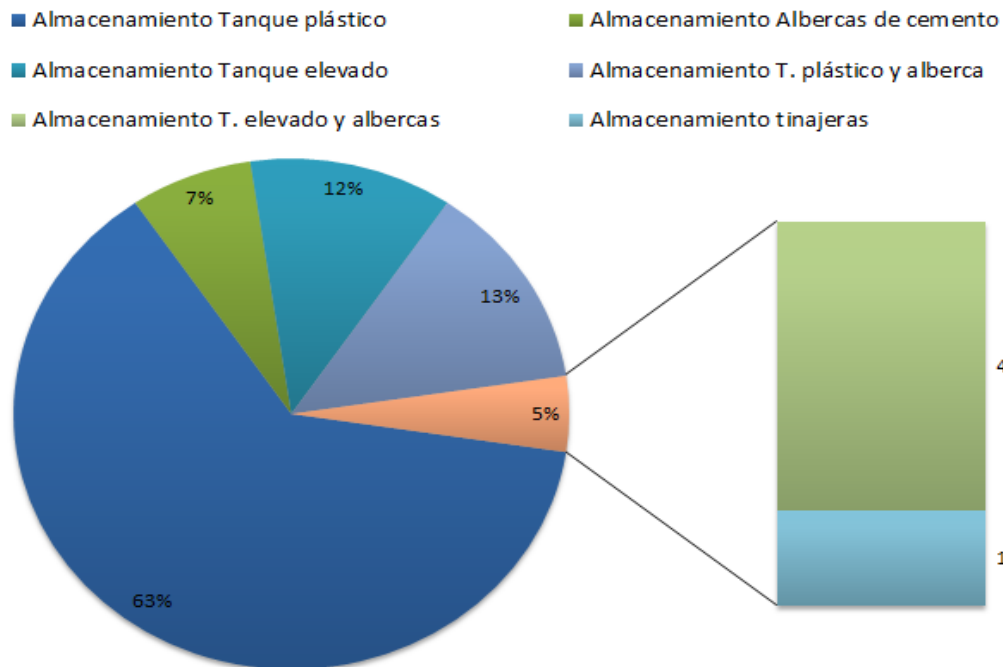
4.1.1. Presencia de animales domésticos: De las encuestas realizadas se escogieron variables que representan factores de riesgo para la contaminación microbiana del agua en los hogares estudiados. Se destaca la presencia de animales domésticos como perros, gatos, conejos y aves en 54 de las 85 viviendas.



Gráfica 1. Presencia de animales domésticos en casa.

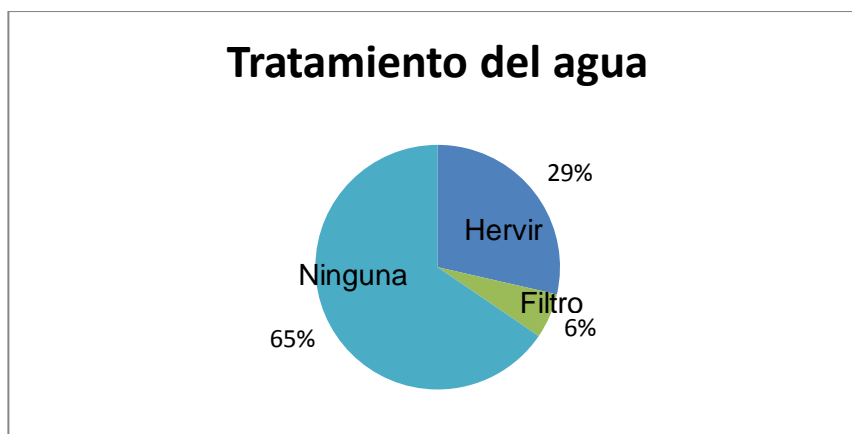
4.1.2. Almacenamiento de agua potable: El almacenamiento del agua juega un papel importante en el mantenimiento de la calidad de la misma ya que si se encuentra expuesta al aire libre se puede ver afectada por el ingreso de partículas contaminantes como lo son formas de resistencia de algunos microorganismos (esporas o quistes) que se encuentran en el ambiente, por ello se quiso conocer los recipientes de almacenamiento más frecuentes en la población de estudio, encontrándose que los tanques de plásticos son los más usados seguidos de los tanques elevados; además se presentó que más del 27% realiza limpieza de los recipientes en tiempo igual o mayor de un mes, lo que ayuda a la formación de biopelículas en la superficie de los mismos.

Almacenamiento agua de consumo



Gráfica 2. Almacenamiento agua de consumo.

4.1.3. Tratamiento previo al consumo del agua: Algunos hogares manifestaron realizar tratamientos adicionales al agua antes de consumirla, por lo que se investigó cuáles eran los más frecuentes y comunes obteniendo como hallazgo importante que el 65 % declaró no realizar ningún tratamiento previo al consumo del agua.



Gráfica 3. Tratamientos previos al consumo del agua

4.1.4. Frecuencia de limpieza tanques de almacenamiento: La limpieza de tanques ayuda a la eliminación de biopelículas por lo que se considera que la frecuencia con que se realiza es un factor de riesgo importante. Se encontró que en 18 de las 84 familias dichos recipientes son lavados una vez al mes y en algunos casos en un periodo de tiempo más prolongado, también que en 12 y 43 de los casos la limpieza es cada tres días y semanalmente respectivamente, tal como lo muestra la **tabla 2**; lo que se puede relacionar con costumbres y hábitos de higiene.

Tabla 1. Frecuencia de lavado de recipientes de almacenamiento de agua potable.

COMUNA	FRECUENCIA DE LAVADO DE TANQUES EN DIAS POR MES				
	12-15 Días	4 Días	2	1 o menos	TOTAL
1	0	7	0	1	8
2	0	7	0	1	8
3	2	6	3	1	12
4	3	3	1	5	12
5	3	4	1	2	10
6	0	5	2	2	9
7	1	6	0	2	9
8	1	4	0	3	8
9	2	2	1	3	8
TOTAL	12	43	11	18	84

4.2. Pruebas moleculares

4.2.1. Detección de ADN bacteriano : En cuanto al estudio molecular tenemos que después de realizar los corridos electroforéticos de los productos obtenidos de PCR para detección del gen 16S ARN, se obtuvieron las bandas esperadas de 1500 pb en tres de las ochenta y cuatro muestras analizadas, las cuales fueron recolectadas en la comuna cinco. Ver tabla N° 3.

Tabla 3. Muestras positivas por comuna.

Comunas	# De muestras colectadas	Muestras positivas
1	8	0
2	8	0
3	12	0
4	12	0
5	10	3
6	9	0
7	9	0
8	8	0
9	8	0
TOTAL	84	3

Tras la secuenciación de las muestras positivas se obtuvieron los electroforegramas resultantes de éstas. Se identificó el ADN el cual correspondió a clones de bacterias no cultivadas, aunque con baja cobertura e identidad. Ver imagen N° 4.

4.2.2. Detección de ADN protozario : En cuanto a la detección de la presencia de ADN de protozoos en las muestras de agua analizadas no se tiene ningún resultado hasta el momento, puesto que el protocolo de PCR no se ha logrado estandarizar debido a que los primers empleados no funcionan como lo establecieron los autores anteriormente citados. Por ello se pretende continuar el proceso con nuevos iniciadores.

Uncultured bacterium clone H8 NEREIS T270d 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JF774459.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

[Go to:](#) ☐

LOCUS JF774459 764 bp DNA linear ENV 17-JUN-2013
DEFINITION Uncultured bacterium clone H8 NEREIS T270d 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence.
ACCESSION JF774459
VERSION JF774459.1 GI:333353655
KEYWORDS ENV.
SOURCE uncultured bacterium
ORGANISM [uncultured bacterium](#)
Bacteria; environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 764)
AUTHORS Stauffert,M., Cravo-Laureau,C., Jezequel,R., Cuny,P., Gilbert,F.,
Militon,C., Amouroux,D., Mahdaoui,F., Bouyssiére,B., Stora,G.,
Merlin,F.-X. and Duran,R.
TITLE Impact of oil on bacterial community structure in bioturbated
sediments
JOURNAL PLoS ONE 8 (6), E65347 (2013)
PUBMED [23762350](#)
REMARK Publication Status: Online-Only
REFERENCE 2 (bases 1 to 764)
AUTHORS Stauffert,M., Cravo-Laureau,C., Jezequel,R., Cuny,P., Gilbert,F.,
Militon,C., Amouroux,D., Mahdaoui,F., Bouyssiére,B., Stora,G.,
Merlin,F.-X. and Duran,R.
TITLE Direct Submission

Figura 3. Resultado del BLAST de las secuencias obtenidas de las muestras positivas.

5. DISCUSIÓN

La contaminación del agua está dada por factores de todo tipo como se ha mencionado anteriormente, entre ellos el microbiológico, del cual el consumidor tiene cierta responsabilidad debido al tratamiento que éste le da al recibirla en sus hogares; en los cuales también se puede presentar contaminación del agua debido a la forma de transporte, condiciones de vida de los habitantes y por la mala higiene que se le da a los tanques de almacenamiento. Aunque en este trabajo se obtuvo una “baja” detección de microorganismos, es importante tener en cuenta la capacidad que estos tienen de permanecer largos periodos de tiempo en condiciones desfavorables de limpieza o desinfección de los recipientes utilizados en el almacenamiento, de las 3 muestras positivas por PCR pertenecientes a la comuna cinco, 2 fueron de viviendas en las cuales se manifestó que la limpieza de los recipientes era en tiempo mayor de 1 mes; por lo cual la presencia de estos microorganismos se podría deber a la formación de biopelículas en la superficie de los recipientes por falta de limpieza y remoción de residuos que contribuyen a la aparición de las mismas . La OMS dice que la Enfermedad diarreica aguda ocasionada por el consumo de agua es prevenible siempre y cuando se eviten factores de riesgo y se practiquen normas de higiene tales como tratamientos previos al consumo en el hogar, como el uso de filtros y hervir el agua para eliminar las formas resistentes de algunos microorganismos causantes de enfermedades de origen hídrico. (14,28).

La presencia de animales domésticos y roedores en las viviendas puede contribuir al deterioro de la calidad del agua potable, teniendo en cuenta que éstos actúan como reservorio u hospederos de muchos microorganismos patógenos. De allí que llame la atención el hecho de que en más del 60% de las viviendas incluidas en el presente estudio tuvieran animales de éste tipo, ya que en la mayoría, el número de animales sobrepasa los tres por vivienda siendo perros y gatos los más frecuentes. Estudios demuestran que la presencia de gatos y la poca higiene puede contribuir a la aparición de enfermedades zoonóticas directas

o indirectas, siendo ésta última por la contaminación de agua o alimentos con heces de los animales (29,30).

La detección de bacterias y protozoarios en las muestras analizadas se pudo ver afectada por el volumen de agua usado para el análisis, siendo este no mayor de 50 ml, lo que reduce la posibilidad de detectar la presencia de los mismos. Tal como refieren otros estudios, el volumen debió ser mayor a 1 L de agua y al igual que la ley colombiana en la NTC 4772 Y el Decreto 1575 de 2007 que establece que para técnica de filtración por membrana de agua potable el volumen no debe ser menor a 100 ml. (24,31,32).

La presencia de bacterias detectadas en este estudio puede estar estrechamente relacionada con la red de distribución y los recipientes de almacenamientos del agua, en donde se pueden formar biopelículas que brindan protección a los microorganismos de condiciones extremas físicas, químicas, biológicas y ambientales, además que en estas biopelículas estos microorganismos también pueden señalizarse, transferir nutrientes e intercambiar material genético. Cabe resaltar que como en el presente estudio muchos de los microorganismos que se encuentran en las biopelículas no representan una amenaza para la salud humana, estas también pueden servir como un medio óptimo para el crecimiento, desarrollo y protección de microorganismos patógenos oportunistas como *Aeromonas spp*, *Pseudomonas* y *Flavobacterium* o potencialmente patógenos como es el caso de *Legionella spp*, la cual puede generar serios problemas cuando es dispersa en aerosol; este caso particular de dispersión se da en los grifos o en las duchas donde estos microorganismos pueden ser liberados al medio en forma de aerosoles y ser ingeridos vía aérea (28,33)

En esta investigación se empleó la técnica PCR para la detección de ADN de bacterias y protozoarios, utilizada ampliamente en diversas investigaciones para la detección del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal (16S rRNA). Esta molécula de alrededor 1.500 pb, presente en todas las bacterias, fue

la primera en utilizarse para identificación bacteriana y ha sido la más utilizada para estudios de filogenia y taxonomía, lo que ha contribuido a que existan numerosas bases de datos. Aunque la detección de la presencia del gen 16S rRNA por sí sólo no permite establecer la identidad del organismo analizado puesto que es una macromolécula común en todos los procariotas es considerado la diana universal para establecer la presencia de bacterias en una muestra. Estudios recientes de comunidades microbianas ambientales mediante PCR han realizado comparación de los resultados obtenidos por ésta técnica y la aplicación técnicas convencionales como los análisis de actividad metabólica de las mismas; por lo que se puede inferir que tanto la técnica de PCR como el gen usado en ésta investigación son buenas herramientas en la detección de bacterias a nivel de comunidad en todo tipo de muestras. (34–36).

La detección de protozoarios no se pudo realizar, debido que los primers utilizados no funcionaron como se describe en la literatura de referencia a pesar de haber ensayado diferentes perfiles térmicos teniendo en cuenta la temperatura melting de los mismos, adicionalmente se realizaron pruebas con ADN de protozoarios conocidos (control positivo) y con muestras de agua ambientales, las cuales fueron analizadas por microscopia y mostraban la presencia de amebas y flagelados. También se hicieron ensayos en el software Geneious para verificar la funcionalidad de éstos, obteniéndose resultados diferentes a los expresados por Shanan y colaboradores en su estudio; por lo tanto se pudo establecer que la cantidad de nucleótidos usados en dichos cebadores y en un estudio similar en muestras de agua ambientales en Sudán difieren en cantidad respecto a los primers diseñados inicialmente para detección del fragmento 18s rRNA en protozoarios extraídos de rumiantes. (26, 37)

Para concluir, teniendo en cuenta los resultados obtenidos y los datos suministrados por el SIVICAP se puede decir que el agua que consumen los habitantes de Sincelejo no representa ningún riesgo para la salud de los habitantes, sin embargo se pudo constatar la presencia de factores de riesgo por parte de las personas, los cuales hacen que sea posible la contaminación del

preciado líquido ; por lo tanto se considera necesario educar a la población para evitar la presentación y reducir el número de casos de Enfermedades Vehiculizadas por el agua en la zona de estudio.

6. CONCLUSIONES

Existen hábitos de higiene y prácticas domésticas que influyen en la contaminación del agua potable cuando ya se encuentra almacenada en los domicilios.

Existen bacterias presentes en el agua destinada para el consumo humano, y aunque metabólicamente sean viables o no, su hallazgo es de gran importancia ya que permite cuestionar si los tratamientos de desinfección están siendo efectivos o no.

En el agua potable del municipio de Sincelejo para el consumo humano hay presencia de microorganismos y aunque queda la duda si son patógenos o no se expone un problema que podría afectar la salud pública del municipio.

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar el presente trabajo para detección de protozoarios y así completar el estudio de comunidades microbianas.
- Es recomendable realizar un estudio donde se investigue la viabilidad de los microorganismos presentes en las muestras de agua analizadas, con el objetivo de establecer el potencial de éstos para causar infección en los consumidores.
- Se considera necesario realizar un proceso que permita identificar si los microorganismos hallados en las unidades de análisis son ambientales y no representan peligro para los humanos o si por el contrario son patógenos capaces de causar enfermedad.
- Para un estudio más completo se recomienda incluir como unidad de investigación a los virus, ya que éstos también suelen causar una gran cantidad de enfermedades vehiculizadas por el agua.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Semarnat. Agua. Semarnat/Conagua [Internet]. 2010;4:82–120. Available from:
http://www.semarnat.gob.mx/archivosanteriores/informacionambiental/Documents/05_serie/yelmedioambiente/4_agua_v08.pdf
2. Auge M. Agua fuente de vida [Internet]. Salud mundial. 2007. Available from:
<http://tierra.rediris.es/hidrored/ebooks/miguel/AguaFuenteVida.pdf>
3. Gorchev. Aspectos microbiológicos. Guías para la Calidad de Agua Potable de la Organización Mundial de la Salud. 2004.
4. Reasoner DJ. Agentes patógenos en el agua potable - Estado actual y perspectiva. 2005.
5. Centros Médicos Dr. Stamboulia. Técnicas moleculares de Microbiología en la práctica diaria. Bioanálisis. 2006;Nº 8 Marzo:1–5.
6. Bos R. A global picture of the diverse links between water and health. Geoscience. 2005;337(1–2):277–8.
7. SIVICAP. Boletín Vigilancia del Agua, N°5 Mayo 2016. 2016.
8. Cirelli AF. Evaluación de la condición del agua para consumo humano en Latinoamérica. Tecnol solares para la desinfección y descontaminación del agua. 1990;17–32.
9. Alexander J, Cifuentes H. El agua del municipio de Facatativa como vector de transmisión de Rotavirus Grupo A. 2007.
10. Jeena MI, Deepa P, Mujeeb Rahiman KM, Shanthi RT, Hatha AAM. Risk assessment of heterotrophic bacteria from bottled drinking water sold in Indian markets. Int J Hyg Environ Health. 2006;209(2):191–6.
11. Boulos BPF, Member A, Altman T, Jarrige P, Collevati F. NETWORK-WATER-QUALITY MODELS. J WATER Resour Plan Manag. 1995;121(6084):49–60.
12. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica. 2014. 2-5 p.
13. Comunicación corta EVOLUCIÓN DE LOS PROTOZOOS J.G. Rodríguez Diego*, J.L. Olivares**, J. Arece***. Salud Anim. 2010;32(2):118–20.

14. Venegas B C, Mercado R M, Campos MC. Evaluación De La Calidad Microbiológica Del Agua Para Consumo Y Del Agua Residual En Una Población De Bogotá (Colombia). *Rev Biosalud*. 2014;13(2):24–35.
15. Araya IA, Sc M. Riesgo microbiológico en sistemas de abastecimiento de agua para consumo humano. :12–8.
16. Cardona-Castro NM, Sánchez-Jiménez MM, Usuga-Silva LY, Arboleda-Naranjo M, Garzón E, Vélez A, et al. Caracterización de dos brotes de fiebre tifoidea en Apartadó, Antioquia, 2005. *Biomédica* [Internet]. 2007;236–43. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572007000200010&lang=es
17. Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The global burden of typhoid fever. Vol. 82, *Bulletin of the World Health Organization*. 2004.
18. Calacich OMC, Zuccolotto-garcía O, Jiménez-balderas E, Muñoz-pérez DH, Hechem-cárdenas JM, Terán-suárez JM, et al. Salud en Tabasco *Salud en Tabasco Contents*. 2001;7(2).
19. Ghenghesh KS, Ghanghish K, BenDarif ET, Shembesh K, Franka E. Prevalence of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium* spp. in Libya: 2000-2015. *Libyan J Med* [Internet]. 2016;11:32088. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27363524> \n <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4929352>
20. Peralta MPV. Técnicas Básicas de la Biología Molecular . 2010.
21. Fierro FF. Electroforesis de ADN. In: *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. 2014. p. 27–52.
22. Rentarí M. Breve revisión de los marcadores moleculares. In: *Blood* [Internet]. 2000. p. 541–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19171877>
23. Alcaldía e Sincelejo. Sitio oficial de Sincelejo-Sucre [Internet]. Información general -Nuestro municipio. 2016. Available from: http://www.sincelejo-sucre.gov.co/informacion_general.shtml

24. Memory Tekere. Metagenomic analysis of bacterial diversity of Siloam hot water spring, Limpopo, South Africa. *African J Biotechnol.* 2011;10(78):18005–12.
25. Extraction M, Sodium C, Ice-cold I. DNA extraction from water : 50-50-50 buffer-chloroform / phenol method. 2004;1–5.
26. Shanan S, Abd H, Bayoumi M, Saeed A, Sandström G. Prevalence of Protozoa Species in Drinking and Environmental Water Sources in Sudan. 2015;2015.
27. Invitrogen. PureLink ® Quick Gel Extraction Kit. In 2011. p. 24.
28. Gelves MF. Deterioro de la calidad del agua por el posible desprendimiento de las biopelículas en las redes de distribución de agua potable. Universidad de los Andes. p. 16.
29. Ríos AP. Mascotas en los hogares: Enfermedades de los niños adquiridas por convivencia con animales. *Enfermedades Infecc y Microbiol.* 2003;23(4):137–48.
30. Fernández H, Vera F, Villanueva MP. Especies de *Arcobacter* y *Campylobacter* en aves y mamíferos del sur de Chile. *Arch Med Vet.* 2007;39(2):163–5.
31. Ministerio de La Protección Social. Decreto No. 1575 de 2007 [Internet]. Diario Oficial 2007 p. 1–14. Available from: file:///C:/Users/Estacion 6/Downloads/n16Dmps1575.htm
32. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. NTC 4772. 2008.
33. Murgu L. Calidad del agua la y Salu d : Las biop películas y Legionella. *J Selva Andin Reseaech Soc Boliv.* 2012;3:45–51.
34. Helena PM, Ana María GD, Patricia GC, Marcela LL. “PCR universal o de amplio espectro”: Un aporte a la detección e identificación de bacterias y hongos en la práctica clínica. *Rev Med Chil.* 2009;137(8):1122–5.
35. Rosselli R, Romoli O, Vitulo N, Vezzi A, Campanaro S, de Pascale F, et al. Direct 16S rRNA-seq from bacterial communities: a PCR-independent approach to simultaneously assess microbial diversity and functional activity potential of each taxon. *Nature* [Internet]. 2016;6(August):1–12. Available

from: <http://www.nature.com/articles/srep32165>

36. Rodicio MDR, Mendoza MDC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(4):238–45.
37. S. K. R. Karnati, Z. Yu, J. T. Sylvester, B. A. Dehority, M. Morrison, and J. L. Firkins, “Technical note: specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA Extracted from ruminant samples of cows,” *Journal of Animal Science*, vol. 81, no. 3, pp. 812–815, 2003.
38. Organización Mundial de la Salud. Nota Descriptiva Hepatitis A [Internet]. Centro de Prensa 2016. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs328/es/>
39. Organización Mundial de la Salud. Nota Descriptiva Hepatitis B [Internet]. Centro de Prensa 2016. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/es/>
40. Ricardo Ocampo, Luz Cardozo, Germán López, María Álvarez. Evaluación de métodos moleculares y microscópicos para la detección de *Cryptosporidium* spp (Apicomplexa-Cryptosporidiida). *Biosalud*, Vol. 10, pp 19-29. 2011.
41. Carolina Palomino, Yuniesky Gonzalez. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev Perú Exp. Salud Pública*. 2014.
42. La biología molecular aplicada a la detección de patógenos en alimentos. *Life Technologies*.